

# 醋酸丙氨瑞林对人子宫内膜癌裸鼠皮下移植瘤的作用及对 TRF2 表达的影响

范静静<sup>1</sup>, 张三元<sup>2</sup>, 苏焕成<sup>2</sup>, 段扬帆<sup>1</sup>

1. 山西医科大学, 山西 太原 030000; 2. 山西医科大学附属第一医院妇科, 山西 太原 030000

**摘要:** **目的** 探讨不同剂量的醋酸丙氨瑞林对人子宫内膜癌裸鼠皮下移植瘤生长的抑制及端粒重复因子 2 (telomeric repeat binding factor-2, TRF2) 表达的影响。**方法** 选取雌性裸鼠 34 只, 无菌条件下饲养。体外培养人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞株, 制成悬液接种于裸鼠皮下组织以建立人子宫内膜癌裸鼠皮下移植瘤模型。选取 32 只合格的荷瘤裸鼠随机分为 4 组: 对照组 (生理盐水肌内注射), 低、中、高剂量丙氨瑞林干预组 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  醋酸丙氨瑞林肌内注射), 每组 8 只。观察裸鼠生长发育情况, 每 7 天测量皮下移植瘤体积, 4 周后处死裸鼠, 取出移植瘤, 测量肿瘤体积, 并绘制生长曲线、计算抑瘤率。移植瘤组织石蜡包埋行 HE 染色, 镜下观察瘤细胞形态变化; 免疫组织化学法检测瘤组织中 TRF2 蛋白的表达情况。**结果** 与对照组比较, 丙氨瑞林干预组随药物剂量增加移植瘤体积依次减小 ( $P < 0.05$ ); 丙氨瑞林低、中、高剂量干预组抑瘤率分别为 10.01%、19.80%、44.98%, 高剂量组抑瘤率大于低、中剂量组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。HE 染色光镜观察见丙氨瑞林干预组瘤细胞排列较对照组稀疏, 瘤细胞核深染、固缩。免疫组织化学检测显示, 随着药物剂量增加, 瘤组织中 TRF2 蛋白表达逐渐下调 ( $P < 0.05$ )。**结论** 醋酸丙氨瑞林对荷瘤裸鼠子宫内膜癌细胞株 HEC-1B 皮下移植瘤生长有抑制作用, 可能与 TRF2 蛋白表达下调有关。

**关键词:** 子宫内膜癌; 丙氨瑞林; 裸鼠; 移植瘤; 端粒重复因子 2; 促性腺激素释放激素类似物  
**中图分类号:** R-33 R 737.33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)07-0948-03

## Effect of alarelin acetate on growth of subcutaneous xenograft tumor of human endometrial carcinoma and expression of TRF2 in nude mice

FAN Jing-jing\*, ZHANG San-yuan, SU Huan-cheng, DUAN Yang-fan

\*Shanxi medical university, Taiyuan, Shanxi 030000, China

Corresponding author: ZHANG San-yuan, E-mail: zsyprofessor@aliyun.com

**Abstract: Objective** To explore the effect of intervention with different doses of alarelin acetate on the growth of subcutaneous xenograft tumor of human endometrial carcinoma and the expression of telomeric repeat binding factor-2 (TRF2) in tumor bearing nude mice. **Methods** Thirty-four female nude mice were chosen and fed under sterile condition. Human endometrial cancer cell line HEC-1-B cells were cultured in vitro and were inoculated into subcutaneous tissue of nude mice after being made into suspension to establish human endometrial carcinoma xenograft tumor model. Thirty-two qualified tumor bearing nude mice were randomly divided into four groups ( $n = 8$  each): control group (intramuscular injection of normal saline), intervention groups with low, medium and high dose of alarelin (intramuscular injection of 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of alarelin acetate). The growth and development situation of bearing nude mice was observed, and the volume of subcutaneous xenograft tumor was measured once every 7 days. The nude mice were sacrificed 4 weeks late, and the xenograft tumor was taken out, then the tumor volume was measured. The growth curve was drawn, and the tumor inhibition rate was calculated. The xenograft tumor tissues were embedded with paraffin, and HE staining was made to observe the morphological changes of tumor cells by light microscopy. The immunohistochemical method was used to detect the expression of TRF2 protein in tumor tissues. **Results** Compared with control group, the xenograft tumor volume decreased with the increase of drug doses in alarelin intervention groups ( $P < 0.05$ ). The tumor inhibition rates in alarelin intervention

groups with low, medium and high doses of alarelin were 10.01% ,19.80% ,44.98% , respectively, and the tumor inhibition rate in alarelin intervention group of high dose was significantly higher than those in alarelin intervention group of low and medium doses ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The HE staining under light microscope observation results showed that compared with control group, the tumor cells presented sparse array, and the cell nucleus presented deep dyeing and shrinkage in alarelin intervention groups. The immunohistochemical method showed that the expression of TRF2 protein was down-regulated gradually with the increase of drug doses ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Alarelin acetate has inhibitory effect on growth of subcutaneous xenograft tumor of human endometrial carcinoma cell line HEC-1-B cells in tumor bearing nude mice, and the mechanism may be associated with the down-regulation of TRF2 protein.

**Key words:** Endometrial carcinoma; Alarelin; Nude mice; Transplantation Tumor; Telomeric repeat binding factor-2; Gonadotropin releasing hormone analogue

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,约占女性恶性肿瘤的7%。自2008年以来,全球发病率上升了21%,死亡率增长至原来的2倍<sup>[1-2]</sup>。40岁以下的患者逐年增加,有些患者有二胎意愿,保留子宫的要求强烈。晚期和复发患者以及合并严重高危因素的患者,需要辅助放疗、化疗及激素治疗<sup>[2]</sup>。激素治疗与常用的化疗药物相比,有安全性高、毒性较小的特点,备受关注。促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)类似物(GnRHa)是激素治疗EC的新途径。GnRHa可分为GnRH激动剂和GnRH拮抗剂。丙氨瑞林属于GnRH激动剂,已成功应用于治疗乳腺癌、卵巢癌及前列腺癌等激素依赖性肿瘤<sup>[3]</sup>。本研究以人子宫内膜癌的裸鼠皮下移植瘤为对象,观察丙氨瑞林对移植瘤生长的影响,探讨丙氨瑞林对子宫内膜癌中端粒重复因子2(telomeric repeat binding factor-2, TRF2)的影响,以及GnRHa可能的抑癌机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 雌性裸鼠34只,周龄4~6周,购自中国药品检验所实验中心,许可证为SCXK(京)2012-0001,无菌条件下饲养。子宫内膜癌HEC-1B细胞株,购自中国医学科学院研究所,细胞株表面含有雌、孕激素和GnRH受体。丙氨瑞林由马鞍山丰源制药有限公司生产,批准文号为国药准字H20041094。兔抗TRF2购自武汉博士德生物工程有限公司。二抗购自北京中山金桥试剂公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人子宫内膜癌HEC-1B细胞株(对数期)置于高糖培养基(含有10%胎牛血清和庆大霉素100 U/ml)中培养,将培养基置于CO<sub>2</sub>饱和度为5%的培养箱中(温度37℃、pH值7.2)。待细胞融合时,用胰蛋白酶进行传代。将传代后的细胞置于离心机上离心6 min,再用PBS洗涤3次,稀释后制成

悬液,并将悬液的浓度调整至 $5.0 \times 10^7$ /ml。

1.2.2 移植瘤动物模型 雌性裸鼠34只,无菌条件饲养,于每只裸鼠左前肢腋窝处皮下注射子宫内膜癌细胞株悬液0.2 ml(约含 $8.0 \times 10^6$ 个细胞)。接种后继续饲养,每日观察裸鼠的一般情况,待种植处出现粟粒大小结节时,表示建模成功。

1.2.3 实验分组 待皮下移植瘤结节长至0.5 cm时,去除瘤结节最大及最小的两只裸鼠。将剩余裸鼠随机分成4组,即:生理盐水对照组,低、中、高剂量丙氨瑞林组(20 μg/kg、40 μg/kg、80 μg/kg),每组8只。按剂量分组饲养,每日给予肌注0.2 ml注射液1次,连续4周。每周测量瘤结节的长、短径,计算出肿瘤体积。4周后处死裸鼠,取出皮下瘤结节,并计算瘤结节体积。计算抑瘤率(IR)=[(V对照组)-(V实验组)/V对照组]×100%。抑瘤率大于10%为药敏阳性。

1.2.4 免疫组化方法检测各组的TRF2表达 将各组的移植瘤组织均匀的切成直径约0.5 cm的组织块,10%甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE染色,镜下观察。取石蜡标本连续4 μm切片,免疫组织化学染色,并在光镜下观察。移植瘤细胞中TRF2在胞浆和细胞核中均有表达,主要位于胞核。每张切片随机选取5个不重复、不相邻的高倍视野(×400)用病理图像分析软件分析阳性灰度值,取平均数后进行统计学分析。

1.3 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 人子宫内膜癌裸鼠移植瘤的建立 在裸鼠左前肢腋窝处接种后,局部皮下发红、肿胀,之后形成小皮丘,逐渐增大,形成瘤体。期间观察裸鼠的一般情况,每7天测量移植瘤体积。

2.2 药物干预后瘤体的变化及细胞学改变 低、中、

高剂量丙氨瑞林组肿瘤体积均小于对照组,且随药物剂量增加瘤体体积逐渐减小,抑瘤率逐渐提高( $P < 0.05$ )。光学显微镜下观察:对照组移植瘤组织结构排列紊乱,瘤细胞紧密重叠,有明显异型性,细胞核体积和核浆比明显增大,分布不均,核染色较深;给予醋酸丙氨瑞林治疗后移植瘤细胞排列较前明显稀疏,局部区域可见片状无结构的坏死区。各组的抑瘤率均大于 10%。见表 1。

表 1 不同剂量丙氨瑞林对裸鼠移植瘤生长的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ )	抑瘤率 (%)
对照组	8	1645.11 $\pm$ 80.14	-
丙氨瑞林低剂量组	8	1480.02 $\pm$ 90.50 <sup>a</sup>	10.03
丙氨瑞林中剂量组	8	1319.33 $\pm$ 67.91 <sup>ab</sup>	19.80
丙氨瑞林高剂量组	8	905.19 $\pm$ 171.45 <sup>abc</sup>	44.98

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 丙氨瑞林对 TRF2 表达的影响 对瘤结节行免疫组织化学法染色后观察,TRF2 蛋白阳性染色位于胞核或者胞浆内,主要位于胞核中,呈棕黄色颗粒,随着丙氨瑞林剂量增加,棕黄色颗粒减少。对病理图像分析进行灰度测定,结果显示随着丙氨瑞林剂量增加,TRF2 的表达强度降低,灰度值增高。对照组灰度值为 121.03  $\pm$  7.13,低、中、高剂量组平均灰度值分别为 158.11  $\pm$  4.58、177.29  $\pm$  6.02、190.78  $\pm$  10.91,不同剂量组平均灰度值差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

GnRHa 是人工合成的促性腺激素释放激素的九肽类似物,GnRHa 可分为 GnRH 激动剂和 GnRH 拮抗剂,丙氨瑞林属于 GnRH 激动剂。经过化学修饰后的 GnRHa 半衰期延长、化学性质稳定,同时也能减缓肽键降解的速度,使得其与受体结合的能力增强<sup>[4]</sup>。用药初期可刺激垂体释放促黄体释放素(LH)和促卵泡生成素(FSH),引起卵巢源性甾体激素短暂性升高,重复用药可通过抢占受体而抑制垂体释放 LH 及 FSH,使血中的雌二醇水平下降,达到去卵巢的作用,这种抑制是其应用于激素依赖性疾病的基础。在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤中已得到应用<sup>[5-6]</sup>。

端粒结合蛋白包括端粒酶、保卫蛋白复合体及非保卫蛋白。三类结合蛋白协同参与端粒动态平衡稳定<sup>[7]</sup>。TRF2 是保卫蛋白复合体的一个组成部分,TRF2 在正常细胞及肿瘤细胞中均广泛的表达,但两者的表达水平不同。TRF2 可通过诱发端粒发生功能

异常或改变细胞的监测点促进肿瘤的发生<sup>[8]</sup>。临床研究发现,外周血的平均端粒长度异常与癌症发病风险升高显著相关,端粒缩短导致的端粒功能失调是肿瘤早期染色体融合的原因<sup>[9-10]</sup>。Nijjar 等<sup>[11]</sup>研究发现,人乳腺表皮 HMEC 细胞经过一系列的作用永生代化后,与只有有限代数生命的细胞相比,TRF2 水平显著上调 10~15 倍。TRF2 表达的上调可能影响到端粒结构完整性的维持,导致端粒功能失衡而致癌变。

本实验以人子宫内膜癌的裸鼠皮下移植瘤为研究对象,经丙氨瑞林干预后,裸鼠移植瘤的体积减小,同时检测出 TRF2 表达的下降。根据以上结果,可以推测丙氨瑞林可能是通过下调 TRF2 的表达来抑制子宫内膜癌细胞的增殖。综合对保卫蛋白复合体中其他因子的实验结果,可以推测该复合体参与了癌症的发生、发展,但具体机制仍不清楚,尚待进一步研究明确。随着 GnRH 抑制肿瘤作用机制的研究深入,希望可以获得新的治疗靶点。

### 参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] 谢幸, 苟文丽, 林仲秋, 等. 妇产科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 313-314.
- [3] Rose PG. Endometrial carcinoma[J]. N Engl J Med, 1996, 335(9): 640-649.
- [4] 张玉泉, 曹斌融, 张惜阴, 等. 丙氨瑞林对子宫内膜癌细胞株 HEC-1 作用的研究[J]. 南通医学院学报, 2000, 20(1): 53-53.
- [5] Chabbert-Buffet N, Olivennes F, Bouchard P. GnRH antagonists[J]. Clin Obstet Gynecol, 2003, 46(2): 254-264.
- [6] 戴钟英. 子宫内膜癌的激素治疗[J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(5): 268-269.
- [7] 杨瑜, 吴志宏, 邱贵兴. GnRH 的功能、作用机制及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 中华外科杂志, 2007, 41(3): 231-233.
- [8] Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, et al. Expression of mRNAs for telomeric repeat binding factor (TRF)-1 and TRF2 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(3): 1105-1111.
- [9] De Lange T. Selterin; the Protein complex that shapes and safeguards human telomeres [J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2100-2110.
- [10] Gisselsson D. Chromosome instability in cancer: how, when, and where? [J]. Adv Cancer Re, 2003, 87: 1-29.
- [11] Nijjar T, Bassett E, Garbe J, et al. Accumulation and altered localization of telomere-associated protein TRF2 in immortalized transformed and tumor-derived human breast cells [J]. Oncogene, 2005, 24(20): 3369-3376.